

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152211

UDC _____

厦 门 大 学

_____ 硕 士 _____ 学 位 论 文

WSSV蛋白对对虾PjCaspase启动子的调控
及*Vibrio zhanjiangensis* sp. nov的鉴定

Regulation of shrimp PjCaspase promoter by WSSV protein
and characterization of *Vibrio zhanjiangensis* sp. nov

左华丽

指导教师姓名: 王义权 教授

王 蔚 副研究员

专 业 名 称: 遗传学

论文提交日期: 2012 年 5 月 7 日

论文答辩时间: 2012 年 6 月 4 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）
课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）
经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。

（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，
未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

1 引言	1
1.1 对虾养殖概况	1
1.2 对虾白斑综合症病毒及对虾免疫系统的研究	2
1.2.1 对虾白斑综合症病毒的基本特征	2
1.2.2 对虾白斑综合症病毒功能基因研究	3
1.2.3 细胞凋亡	4
1.2.4 caspase 研究进展	5
1.3 启动子与启动子结合蛋白的研究方法	10
1.3.1 启动子的分析	10
1.3.2 报告基因	11
1.3.3 启动子结合蛋白的研究方法	12
1.4 对虾弧菌病	13
1.4.1 弧菌属特征	14
1.4.2 弧菌感染症状	14
1.4.3 对虾弧菌病的研究	14
1.5 本论文的目的和意义	15
第一部分 WSSV 蛋白对对虾 PjCaspase 启动子的调控	17
1 前言	17
2 材料与方法	17
2.1 材料	17
2.1.1 试验用材料、细胞、菌株和质粒	17
2.1.2 主要试剂	18
2.1.3 引物	19
2.1.4 主要仪器设备	19
2.1.5 溶液的配制	20

2.2 方法	24
2.2.1 基因组步行法克隆 PjCaspase 基因的启动子	24
2.2.2 PjCaspase 启动子的活性的鉴定	28
2.2.3 PjCaspase 基因的启动子与 WSSV 外膜蛋白的相互作用	29
2.2.4 荧光素酶报告基因系统鉴定	31
3 结果与分析	33
3.1 PjCaspase 启动子的克隆分析	33
3.1.1 基因组步行法克隆 PjCaspase	34
3.1.2 对虾 Caspase 基因的结构分析	34
3.1.3 PjCaspase 启动子区的鉴定	36
3.1.4 由 PjCaspase 启动子驱动报告基因 EGFP 瞬时表达质粒的构建	36
3.1.5 由 PjCaspase 启动子驱动报告基因 EGFP 瞬时表达	37
3.2 PjCaspase 启动子与 WSSV 外膜蛋白的相互作用	38
3.2.1 带有生物素标记的 PjCaspase 启动子片段的制备	38
3.2.2 WSSV 外膜蛋白的制备	39
3.2.3 PjCaspase 启动子基因与 WSSV 外膜蛋白的相互作用	40
3.2.4 蛋白质质谱结果鉴定图	41
3.2.5 荧光素酶报告基因系统鉴定	42
4 讨论	44
5 小结与展望	46
5.1 小结	46
5.2 展望	47
第二部分 <i>Vibrio zhanjiangensis</i> SP. NOV 的鉴定	48
1 前言	48
2 材料和方法	48
2.1 实验材料	48
2.1.1 样品来源	48

2.1.2 工具酶及试剂盒	48
2.1.3 生化试剂	49
2.1.4 主要仪器	49
2.1.5 菌株与载体	50
2.1.6 引物	50
2.1.7 序列分析处理软件	50
2.1.8 主要溶液和培养基	51
2.2 基本方法	52
2.2.1 细菌单菌 DNA 的提取	52
2.2.2 16S rRNA 和看家基因的扩增	53
2.2.3 菌落 PCR	54
2.2.4 细菌新种的鉴定分析	55
3 结果与讨论	59
3.1 菌种的分离和鉴定	59
3.1.1 菌株的分离	59
3.1.2 表型分析	60
3.1.3 脂肪酸分析	63
3.1.4 16S rRNA 系统发育分析	64
3.1.5 看家基因序列分析	67
3.1.6 G+C 含量分析和 DNA 相似度	68
3.2 讨论	69
4 湛江弧菌新种的描述	70
5 小结与展望	71
5.1 小结	71
5.2 展望	72
参考文献	73
致 谢	81
附 录	82

Content

1 Introduction	1
1.1 Summary of shrimp culture	1
1.2 Studies on WSSV and functional genomics	2
1.2.1 Basic characteristics of WSSV	3
1.2.3 Apoptosis	4
1.2.4 Progress in caspase research	5
1.3 The research method on promoter and promoter binding protein	10
1.3.1 Promoter analyses	10
1.3.2 Reporter gene	11
1.3.3 The research method on promoter binding protein	12
1.4 Vibrio disease of shrimp	13
1.4.1 Characteristic of Vibrio	14
1.4.2 Symptom of infected by Vibrio	14
1.4.3 Research on vibrio disease of shrimp	14
1.5 The purpose and significance of this thesis	15
Part I Regulation of PjCaspase promoter	17
1 Premise	17
2 Materials and methods	17
2.1 Materials	17
2.1.1 Cells, bacterias and plasmids	17
2.1.2 Main reagents	18
2.1.3 Primer	19
2.1.4 Main equipments	19
2.1.5 Solutions	20
2.2 Methods	24

2.2.1 Cloning of PjCaspase promoter by Genomewalker	24
2.2.2 Identification of PjCaspase promoter activity	28
2.2.3 Interaction of WSSV protein with PjCaspase promoter	29
2.2.4 Identification by luciferase reporter	31
3 Results and analyses	33
3.1 Origin of PjCaspase	33
3.1.1 Cloning of PjCaspase by GenomeWalker	34
3.1.2 Structural analysis of PjCaspase	34
3.1.3 Identification of PjCaspase promoter region	35
3.1.4 Construction of transient expression plasmids	37
3.1.5 Transient expression of reporter gene by PjCaspase promoter	37
3.2 Interaction of WSSV protein with PjCaspase promoter	38
3.2.1 Amplification of biotinylated PjCaspase promoter	39
3.2.3 Preparatiton of WSSV outer membrane protein	39
3.2.4 Interaction of WSSV protein with PjCaspase promoter	40
3.2.5 Mass spectrum map of protein	41
3.2.6 Identification by luciferase reporter assey	42
4 Discussion	44
5 Summary and prospect	46
5.1 Summary	46
5.2 Prospect	47
Part II Characterization of <i>Vibrio zhanjiangensis</i> sp. nov	48
1 Forword	48
2 Materials and methods	48
2.1 Materials	48
2.1.1 Sample collection	48
2.1.2 Enzymes and Kits	48
2.1.3 Major chemicals	49

2.1.4 Major equipments	49
2.1.5 Bacterial strains and vector	50
2.1.6 Primer	50
2.1.7 Analysis softwares	50
2.1.8 Solution and culture medium	51
2.2 Basic method	51
2.2.1 Extration of bacterial genome	52
2.2.2 PCR amplification of 16S rRNA and housekeeping gene	53
2.2.3 Colony PCR	54
2.2.4 Identification of novel species	55
3 Results and discussion	59
3.1 Isolation and characterization of a strain	59
3.1.1 Isolation of a strain	59
3.1.2 Phenotypic analysis	60
3.1.3 Analysis of fatty acid	63
3.1.4 16S rRNA Phylogenetic analysis	64
3.1.5 Sequence analyse of housekeeping gene	67
3.1.6 G–C content determination and DNA–DNA relatednes	68
3.2 Discussion	69
4 Description of <i>Vibrio zhanjiangensis</i> sp. nov	70
5 Summary and prospect	71
5.1 Summary	71
5.2 Prospect	72
Reference	73
Acknowledgement	81
Appendix	82

摘要

近年来, 频繁发生的病毒性和细菌性疾病, 使对虾养殖业蒙受了巨大损失, 严重制约了该产业的可持续发展。本论文围绕对虾病原体展开研究, 主要包括 WSSV 蛋白对对虾 PjCaspase 启动子的调控及分离自海水养殖对虾池塘的菌株 *Vibrio zhanjiangensis* sp. nov 的鉴定两个部分:

(1) caspase 家族在细胞凋亡有重要作用, 以往的研究发现在抗 WSSV 病毒感染的对虾(*Penaeus japonicus*)体内, PjCaspase 显著上调。为了进一步阐明 PjCaspase 在抗病毒感染中的转录调控机制, 本部分研究用基因组步行法(Genome walker)克隆了日本对虾凋亡相关基因 PjCaspase 的 5' 调控区启动子序列。利用此序列构建含有增强绿色荧光蛋白报告基因的启动子重组质粒, 瞬时转染蛾蝶类的 High Five 细胞, 发现 PjCaspase 启动子能驱动 EGFP 报告基因的表达, 说明该启动子具有具有足够启动外源基因表达的活性。我们利用 pull-down、质谱分析等方法, 发现 PjCaspase 启动子与膜蛋白 VP38 以及 VP41B 之间在体外存在互作。荧光素酶报告基因系统分析表明, VP38 和 VP41B 在 PjCaspase 转录过程中分别担当阻抑物和激活物的作用。我们的研究结果拓展了对于 PjCaspase 基因的分子表达机制的认识, 将会对于病毒疾病控制提供帮助。

(2) 本部分对菌株 E414 进行了分离鉴定, 该菌株分离自广东省湛江市海水养殖对虾的池塘中, 为革兰氏阴性菌, 菌体呈杆状, 端生鞭毛, 兼性厌氧生长。将 16S rRNA 提交到 GenBank, 采用 Blast 对比发现, 最为相近的均属于 *Vibrio* 属。用 16S rRNA 构建的系统进化树中, E414 落于与溶珊瑚弧菌最近的簇内。由 rpoA、recA 和 pyrH 三个基因构建的系统进化树分析得出, E414 和近缘种的序列相似性明显低于种间分类界限。菌株所含主要脂肪酸为 C16:1 ω 6c 和/或 C16:1 ω 7c (27.4%), C18:1 ω 7c 和/或 C18:1 ω 6c (19.3%) 和 C16:0 (18.2%), G-C 含量为 38.7 mol%。综合系统发育分析、DNA-DNA 相似性以及生理生化等表型特征分析, E414 菌株具备了弧菌的主要特征, 除此之外还具备与其它模式菌不同的特征, 所以我们认为菌株 E414 应当属于弧菌属中的一个新种。本部分研究旨在发现对虾的潜在致病菌以便为对虾弧菌病的研究提供参考。

关键词: caspase; 启动子; WSSV; 弧菌

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Recent years, shrimp culture suffered great damage from viral and bacterial diseases, so its sustainable development was seriously constrained. This paper focuses on the research of shrimp pathogens, mainly includes regulation of shrimp PjCaspase promoter and characterization of *Vibrio zhanjiangensis* sp. nov:

(1) Members of the Caspase family play essential roles in apoptosis. In kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* the caspase gene (PjCaspase) was previously found dramatically up-regulated in viral-challenged and -resistant shrimp. In order to further delineate the transcriptional regulation of PjCaspase in response to viral infection, Genome walker was applied to clone *Penaeus japonicus* apoptosis related 5'-flanking region of PjCaspase promoter sequence. High Five cell was used for the promoter activity assay and green EGFP fluorescent signals were observed in cells. We employed the cloned promoter region of PjCaspase for affinity binding assays to identify potential PjCaspase regulatory proteins in WSSV, two envelope proteins VP38 and VP41B of white spot syndrome virus (WSSV) were found to bind to PjCaspase promoter in vitro. Luciferase reporter assay revealed that the proteins act as repressor and activator of PjCaspase transcription respectively. Our study provides insights into the molecular regulation of PjCaspase gene expression, which will be helpful for shrimp viral disease control.

(2) This part focuses on characterization of a strain E414, which is a Gram-negative, facultatively anaerobic, motile by means of single polar flagellum and was isolated from sea water collected from farming pond rearing marine shrimp in Zhanjiang. 16S rRNA was compared against the GenBank database, result showed that strains belonged to the genus *Vibrio*. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences locate strain E414 in the vicinity of the coralliilyticus clade within the genus *Vibrio*. The phylogenetic analyses based on the genes *rpoA*, *recA*, and *pyrH* revealed that the sequence similarity values were in all cases lower than the limit of

intraspecies. The major fatty acid components are C16:1 ω 6c and/or C16:1 ω 7c (27.4%), C18:1 ω 7c and/or C18:1 ω 6c (19.3%) and C16:0 (18.2%).The DNA G-C content of strain E414 was 38.7 mol%. The Strain E414 has the main phenotypic features of the genus vibrio.Based on differential phenotypic properties, fatty acid profile, 16S rRNA gene sequence, DNA–DNA relatedness values et al, it is concluded that the strain E414 represent a new species of *Vibrio*. This study aims to find potential prawn pathogenic bacteria in order to provide a basis for further research on *Vibrio* diseases.

Keywords: caspase; promoter; WSSV; *Vibrio*

1 引言

1.1 对虾养殖概况

世界对虾养殖业自上个世纪 70 年代兴起并在 80 年代得到飞速发展。从 1984 年到 1999 年, 世界对虾养殖产量从占对虾总产量的 20% 达到总产量的 50%, 对虾产量增长了 6 倍, 对虾总产量已占全部水产品总产量的 14%。而我国养虾业在短短 20 年间飞速发展, 对虾养殖业已成为我国水产养殖业的一个重要产业, 成为我国沿海农民主要的收入来源。对虾在分类上属于节肢动物门, 有鳃亚门, 甲壳纲, 软甲亚纲, 十足目, 游泳亚目, 对虾科, 对虾亚科, 对虾属。对虾是热带、亚热带浅海最占优势的甲壳动物, 它繁殖力强、生长迅速、种类多、种群数量大、肉味鲜美, 是人们非常喜欢的海产食品之一, 因此经济价值很高。然而, 在养虾业高速发展的同时, 人们忽视了对对虾疾病的防治研究, 对虾病害在世界范围内的广泛传播, 给水产养殖和沿海农村经济造成了重大损失。自 1993 年对虾白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 暴发以来, 中国明对虾的养殖一直一蹶不振, 白斑病毒已成为危害对虾养殖的最主要病原。虾养殖业快速发展造成了非传染性疾病和传染性疾病滋生、养殖环境恶化、种质资源破坏和种质退化等一系列问题, 严重地制约着对虾养殖业的进一步发展, 我国虾产量从 1992 年的 20 万吨, 下降到 1994 年的 5.5 万吨, 年直接经济损失达数十亿元^[1-6]。

人工养殖对虾的疾病主要由细菌和病毒引起^[7-9]。危害对虾的细菌病病原已报道有数种, 有弧菌、假单胞菌、气单胞菌、毛霉亮发菌以及硫丝菌。真菌引起的疾病主要是对虾幼体的真菌病, 危害性仅次于细菌性疾病。真菌病原有海壶菌、离壶菌和链壶菌三个属。近年虾病暴发流行主要是由病毒感染引起的。对虾病毒病是危害养殖对虾最严重的一种疾病, 至今已发现约 20 种病毒。大量使用抗生素来对对虾细菌病的控制不仅使对虾产生抗药性, 而且还可能引起对虾自身免疫力的下降。同时, 对病毒病目前尚无有效地治疗方法。目前为止国内外治疗对虾病普遍采用的方法是“以防为主”, 希望能够通过提高对虾自身免疫能力来增强对虾自身的抗病力。因此研究此类动物的免疫机制, 有效的提高虾类本身的抗病

能力，是解决病害问题的一条行之有效的途径。自 60 年代以来，国内外学者发表了大量的论文集专著，对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。但是目前为止，对虾白斑综合症病毒仍是对虾养殖业最主要的威胁^[10]。

对虾病毒病已成为阻碍对虾养殖业发展的主要因素，它的爆发不仅带来对虾养殖业经济上的损失，而且对海洋资源的可持续发展还构成了极大的威胁，因此对虾病毒病的研究已成为当前世界虾病研究领域的热点之一^[11]。弧菌病是对虾养殖中常见的、危害也较严重的一类疾病，为解决虾类这一全球性的病害问题，世界各国的研究人员做了大量的工作，一些致病弧菌已陆续被发现，其细菌学特征、致病力和病理等方面均作了广泛而深入的研究，作为当前的研究热点，免疫预防及对虾的免疫机制也进行了许多探索。而解决这一问题的关键是加强对对虾的非特异性免疫系统的研究，从而在此基础上研究出对虾病害防治的新途径。

1.2 对虾白斑综合症病毒及对虾免疫系统的研究

1.2.1 对虾白斑综合症病毒的基本特征

WSSV 毒力极强，为双链 DNA 病毒。1992 年最早发生于台湾南部养殖的日本对虾，90 年代初在中国引起对虾暴发性流行病，造成对虾大面积死亡，4 天内致死率达 90-100%，是全球养殖对虾危害最大的病毒。WSSV 完整病毒粒子具有双层囊膜，呈椭圆形，长约 260-350nm，宽约 110-130nm，纯化的病毒粒子一端带一条细长的尾，通常被认为是由囊膜延伸而来的。棒杆部分平均大小约为 150nm X 350nm，尾部长大约为棒杆部分长度的 1.2~2 倍。核衣壳呈螺旋状圆柱形，中间有 13 条螺旋带状结构，两端各有一帽状结构，每条螺旋带由 11 个衣壳蛋白亚单位组成，每个衣壳蛋白亚单位又是由 3 个呈“>”排列的蛋白亚基组成^[12]。核衣壳大小为 100nm X 300nm，不形成包涵体。

WSSV 的宿主范围极广^[13-15]，除了能够侵染绝大多数种类的对虾之外，还可以侵染海洋生态体系中的多种龙虾类、蟹类、端足类和水蝇类等甲壳纲物种。受 WSSV 感染的对虾多出现厌食、空胃、红体和白斑的症状，在感染后期对虾主要表现为白斑症状，但是在新养殖的对虾中，只有少数个体明显表现出白斑症状，多数个体并无表现，但患病新对虾身体基本上都表现微红。患病对虾通常行动出现异常，弹跳无力，在水面漫游或伏于池边水底不动，很快就会死亡。它的传染力

强，致死率高，被感染的对虾在一周内死亡率高达 90-100%，预防困难，危害极大，因而成为海水养殖病害的研究重点，全世界极为广泛关注^[16]。

目前已有 3 株 WSSV 的全基因组被测序^[17-18]。Yang 等^[18]报道的 WSSV 基因组全序列为 305kb，其基因组约有 97%是特异性的，其余的 3%是由 9 个同源区组成，整个基因组 G+C 含量约为 41%。虽然该病毒与昆虫杆状病毒具有相似的形态，但是它的基因组序列和经预测的蛋白质序列与已知的昆虫杆状病毒却几乎没有同源性，仅有少数几个基因核苷酸和 DNA 复制有关的酶类（如核苷酸还原酶、胸腺嘧啶核苷酸合成酶和 dUTPase 等）、类胶原蛋白和三个病毒结构蛋白与其它病毒或生物的已知蛋白质或结构域有较高的同源性。经过生物信息学分析，该病毒大概有 180 个开放阅读框（open reading frames, ORFs），这 180 个 ORFs 中 80%下游具有 poly(A)。其中 36 个阅读框被报道具有编码功能蛋白的能力，另外 52 个 ORFs 通过 RT-PCR 的方法被确认有转录功能。目前 WSSV 被归类为 Whispovirus 属，它是 Nimaviridae 新科中唯一的成员。

1.2.2 对虾白斑综合症病毒功能基因研究

1.2.2.1 结构蛋白

病毒的结构蛋白除了支撑维持病毒的基本构象，保护病毒的核酸外，还在病毒的入侵、包装和释放中起着重要的作用^[19-22]。结构蛋白是指构成一个形态成熟的、有感染性的病毒颗粒所必需的蛋白质，主要包括膜蛋白和核衣壳蛋白。病毒的结构蛋白除了支撑维持病毒的基本构象，保护病毒的核酸外，还与病毒对组织和细胞的识别以及病毒的吸附和侵入过程密切相关。目前已经确定的结构蛋白包括以下几种：

1) 膜蛋白

膜蛋白在病毒的入侵、包装和释放过程中起着重要的作用，在 WSSV 的功能基因组研究中，膜蛋白吸引了越来越多的注意。目前，已经确认的膜蛋白有 VP19、VP28、VP26 (VP22)、VP68、VP281、VP292、VP466 等。

蛋白 VP19 也是病毒包膜上含量很高的一种蛋白，由 ORF182 编码。van Hulten 等^[23]认为 VP19 是膜蛋白，并进行了 N 末端测序^[24]。VP19 预测有两个穿膜结构域，功能未知。膜蛋白 VP28 是病毒包膜上含量最高的一种蛋白，最早由 van Hulten 从

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库